

马铃薯 A 病毒 CP 基因的克隆 与序列分析

吴兴泉， 陈士华， 吴祖建， 林奇英， 谢联辉

(福建农林大学植物病毒研究所,福州 350002)

摘要：利用根据马铃薯 A 病毒(PVA)外壳蛋白(CP)基因序列设计合成的一对引物,以带毒植物总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增得到长 0.8 kb 的目的片段。将目的片段转入大肠杆菌并进行了序列测定。测序结果与 PVA 其他分离物 CP 基因序列比较,发现其核苷酸同源性最高可达 99%。依据 CP 序列建立了 PVA 病毒的系统进化树并对 PVA 不同分离物 CP 氨基酸序列差异性做了分析。

关键词： 基因工程； 马铃薯 A 病毒； 分子鉴定与检测

中图分类号： Q 781 **文献标识码：** A **文章编号：** 0529-1542(2003)05-0025-04

The clone and sequence analysis on the CP gene of potato virus A WU Xing-quan, CHEN Shi-hua, WU Zu-jian, LIN Qi-Ying, XIE Lian-hui (Plant Virology Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: With the specific primers which were designed based on the potato virus A (PVA) coat protein (CP) gene sequence, one gene fragment (0.8 kb) was amplified by reverse transcription polymerasae chain reaction (RT-PCR) using the total RNA of the plant infected by PVA. The gene was cloned into *Escherichia coli* DH5 α and sequenced. The sequence was compared with the sequence of the homologous gene of other isolates of PVA. The result showed it had high homology with the other isolates (the highest homology could reach 99% of nucleic acid). Based on CP amino acid sequence the phylogenic tree of PVS was established and the isolates were clustered into many groups.

Key words: gene engineering; potato virus A; identification and detection

马铃薯 A 病毒(potato virus A, PVA)可造成马铃薯减产 40% 以上,是马铃薯生产上危害较重的病毒之一。该病毒除随种薯传播,还至少有 7 种蚜虫以非持久性的方式传毒,因此该病毒在我国扩散可能性很大,具有较高流行风险^[1]。迄今有关 PVA 在我国的发生分布报道极少^[2,3]。目前我国马铃薯病毒的检测鉴定主要以免疫学检测技

术为主,未见有 PVA 的商业抗血清,这可能是我国对 PVA 研究滞后的原因。因此 PVA 的快速、准确的分子鉴定与检测技术对该病毒发生分布与危害等研究不但有一定的理论意义,而且具有很高的实用价值。本文利用病毒特异性引物克隆了 PVA CP 基因并进行了序列分析,为该病毒的分子鉴定提供了依据。

1 材料和方法

1.1 酶与试剂

试验所用的限制性内切酶、反转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq 酶、植物 RNA 提取试剂盒、dNTP、DNA 纯化试剂盒分别购自上海生工生物技术有限公司、Boehringer 公司和 Promega 公司。克隆载体采用 Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector System。

1.2 毒源的获得

病毒样品采自福建省寿宁县马铃薯 A 病毒发生区, 经电镜观察和生物学分离接种在普通烟 (*Nicotiana tabacum*) 上保留。

1.3 病毒的分子鉴定

1.3.1 引物设计与合成 依据 PVA (S51667、Y10126、Y11420、Z49088、Y11422、Z21670 分离物) CP 基因序列 (793bp) 设计合成了一对引物: A1 : 5' - GGATCCGAACCTTGATGCAGCG - 3' (为 PVA CP 基因的 1~18nt 序列, 划线处为 *Bam* H I 酶切位点), A2 : 3' : 5' - GAATTCACATCCGTTGCTGT-GTGTCC - 3' (与 PVA CP 基因的 773~793 nt 互补, 划线处为 *Eco* RI 酶切位点) 用于扩增 PVA CP 基因。引物在上海生工生物工程公司合成。

1.3.2 植物总 RNA 的提取 分别取 0.1 g 带毒烟草及健康烟草叶片, 采用 RNA 提取试剂盒 (上海生工生物工程有限公司) 提取植物总 RNA, 溶解于 40 μL 灭菌双蒸水中备用。

1.3.3 反转录 - PCR 扩增 以带毒植物总 RNA 为模板, 以 A1、A2 为引物采用常规方法进行。PCR 反应程序设置: 94℃, 10 min; 后 94℃, 1 min; 50℃, 2 min; 72℃, 2 min。反应 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) 回收纯化。

1.3.4 DNA 序列测定 将 PCR 扩增产物纯化后连接到 pGEM-T Easy Vector 上, 转化通过 *CaCl*2 法制备的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取在加有 IPTG 和 X-Gal 的 LB 平板上生长的白色菌落, 应用碱裂解法小量提取质粒, 利用 *Eco* RI 进行酶切鉴定。PVA CP 基因序列测定由上海基康生物技术有限公司在 ABI PRISM 377 型 DNA 自动测序仪上进行。

1.3.5 DNA 序列分析 采用 www.ncbi.nlm.nih.gov 和 www.ebi.ac.uk 网站分析工具进行。

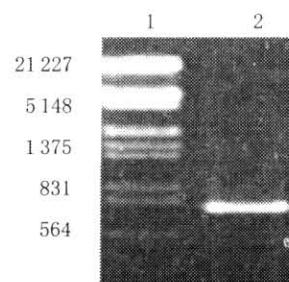
2 结果与分析

2.1 毒源的分离

在福建省寿宁县采集主要症状为花叶的带毒马铃薯叶片。马铃薯品种为德友 1 号。经汁液负染法电镜观察表明, 病毒粒子均为直或稍弯的线条状, 大小为 730 nm × 15 nm, 与 PVA 病毒相符。接种普通烟 (*N. tabacum*) 可产生叶脉坏死症状, 在枸杞 (*Lycium barbarum*) 上产生枯斑。

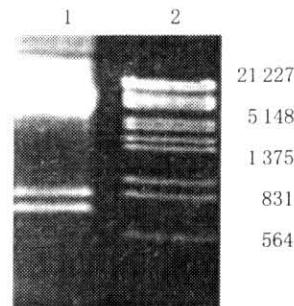
2.2 PVA 分子鉴定

2.2.1 PVA CP 基因的 RT-PCR 扩增及克隆 以带毒植物总 RNA 为模板, 利用 PVA 病毒特异性引物 A1 与 A2 进行反转录及 PCR 扩增, 得到了长度约为 0.8 kb 的目的片段(图 1)。扩增产物经纯化后克隆到 pGEM-T easy 载体上。经蓝白斑筛选、PCR 及酶切鉴定, 得到了含有插入片段的重组子 pTACP(图 2)。



泳道 1. 核酸标准分子量; 泳道 2.PVA CP 基因 RT-PCR 产物

图 1 RT-PCR 扩增 PVA 病毒 CP 基因



泳道 1. *Eco* RI 酶切的质粒 pTACP; 泳道 2. 核酸标准分子量

图 2 重组质粒 pTACP *Eco* RI 酶切鉴定

2.2.2 PVA CP 基因序列测定及同源性比较 对重组克隆进行了序列测定, 结果表明所得目的片段大小为 793 bp, 其中 A 266 个、C 160 个、G 192 个、T 175 个, G+C 含量 44.39%。与已知 PVA 分离物 CP 基因序列进行比较, 结果表明核苷酸序列同源性最高可达 99%, 最低为 90%, 氨基酸序列同源性最高可达 98%, 最低为 92%, 证明成功地扩增得到了 PVA CP 基因 (AF483279)。序列分析结果表明在

681~686 nt 处存在一个 *Eco*RI 酶切位点(gaattc)。该酶切位点在所分析的 25 个分离物中极为保守,为 RT-PCR 扩增 PVA CP 基因时提供了一个简便的鉴定手段,即采用 *Eco*RI 酶切后电泳检测时应出现 0.8kb 和 0.7kb 两条泳带(图 2)。

2.2.3 PVA 不同分离物 CP 氨基酸序列差异性分析

对已知的 25 个 PVA 不同分离物 CP 氨基酸序列进行比较,结果表明不同分离物间 CP 氨基酸序列存在明显差异,同源性在 92%~99% 之间。主要

变异区在 CPN 端的前 30 个氨基酸中,而核心区非常保守。依据 PVA CP 氨基酸序列建立了 PVA 不同分离物的系统进化树(图 3)。分析结果表明,新西兰的 X50804 分离物和芬兰的 AJ131403 分离物 CP 氨基酸序列完全相同,而与其他分离物间的差异较大。从 Y11426 到 Z21670 的 8 个分离物彼此间同源性较高形成一个类群(图 3)。分析表明这 8 个分离物 CP 的 N 端蚜传必须序列 DAG 均发生变异成为 DAS,导致它们失去蚜传能力。

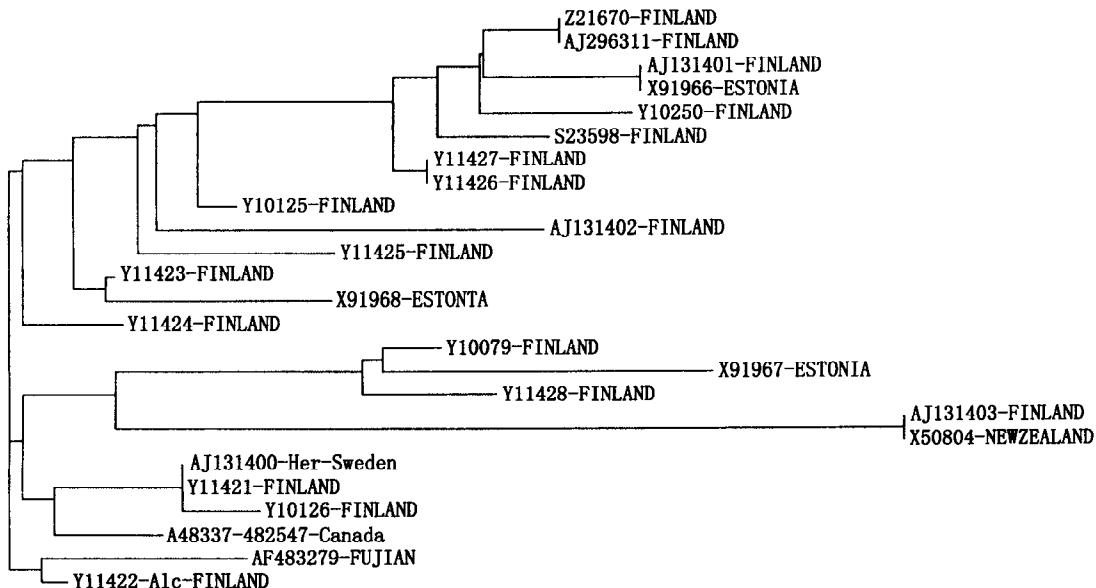


图 3 依据 CP 氨基酸序列建立的 PVA 系统进化树

3 讨论

在马铃薯病毒鉴定中,传统生物学方法仍在使用,其中观察鉴别寄主在接种后的症状反应是鉴别病毒种类的主要标准之一。另外病毒传播途径、介体昆虫的种类、与已知病毒的交叉保护作用、病毒寄主范围、细胞质内含体形态等生物学指标作为病毒鉴定的标准也在使用^[4~7]。上述方法稳定,但耗时长。血清学方法作为区分相关病毒的主要标准仍是目前通常采用的方法,此方法实用但有时会出现假阳性。

目前普遍认为只有通过病毒基因组结构和序列才能真实地阐明植物病毒种的分类^[8~15]。采用分子生物学手段鉴定植物病毒的分析方法主要是建立和分析病毒系统进化树,通过病毒系统进化树可清晰地展示不同种属病毒的进化关系。本文依据 CP 氨基酸序列建立了 PVA 不同分离物间的系统进化树,为病毒的鉴定提供了重要依据,目前在我国尚未见到有关报道。

参考文献:

- 李明福 马铃薯病毒及其检疫重要性初析[J] 植物检疫, 1997, 11(5): 261~264
- 崔荣昌, 李芝芳, 李晓龙 应用酶联免疫吸附试验法鉴定几种主要马铃薯病毒[J] 植物保护学报, 1989, 16(3): 193~197
- 朱国春, 朱国庆 用 DTBA 方法检测马铃薯病毒[J] 马铃薯杂志, 2000, 14(1): 60~61
- 王劲波, 王凤龙, 钱玉梅, 等 山东省烟草病毒原鉴定[J] 中国烟草科学, 1998, (1): 26~29
- Edwardson J R Inclusion bodies[A] In: Potyvirus Taxonomy [C] New York: Springer-Verlag, 1992: 25~30.
- Brunt A A General properties of potyviruses[A] In: Potyvirus Taxonomy[C] Research Signpost Trivandrum, 1993: 19~28
- Shukla D D, Ward C W, Brunt A A The Potyviridae[M] Wallingford UK: CBA International, 1994
- Ward C W, Weiller G, Shukla D D, et al Molecular systematics of the Potyviridae, the largest plant virus family[A] In: Molecular Basis of Virus Evolution[C] London Cambridge University Press, 1995, 477~500.
- Rudra P S, Nie Xianzhou Singh M Duplex RT-PCR reagent concentrations at reverse transcription stage affect the PCR performance [J] Journal of Virological Methods, 2000, 86(2): 121~129

- [10] Nie Xianzhou, Singh R P Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR [J] *Journal of Virological Methods*, 2000, 86(2).179 – 185
- [11] Singh R P, Nie Xianzhou, Singh M Sodium sulphite inhibition of potato and cherry ployphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR[J] *Journal of Virological Methods*, 2002, 99(1) 123 – 131
- [12] Singh M, Singh R P Digoxigenin-labelled cDNA probes for the detection of potato virus Y in dormant potato tubers[J] *Journal of Virological Methods*, 1995, 52(1 – 2) · 133 – 143
- [13] Robinson D J, Romero J Sensitivity and specificity of nucleic acid probes for potato leafrol virus detection[J] *Journal of Virological Methods*, 1991, 34(2).209 – 219
- [14] Rouhiainen L, Laaksonen M, Karjalainen R, et al Rapid detection of a plant virus by solution hybridization using oligonucleotide probes[J] *Journal of Virological Methods*, 1991, 34(1) · 81 – 90
- [15] 张春媚,吴祖建,林奇英,等 水稻草矮病毒血清学和分子检测方法的比较[J] *中国病毒学*,2000,15(4) 361 ~ 366